



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TRABAJO FINAL DE CURSO

**Efecto de compuestos no fenólicos en la capacidad antioxidante en açai  
(*Euterpe oleracea*) y jabuticaba (*Myrciaria Cauliflora*).**

ESTUDIANTE: Melisa Arévalo Fernández  
SUPERVISOR: Prof. Dr. Paulo César Stringheta

VIÇOSA  
SEPTIEMBRE – 2013

## RESUMEN

El consumo mundial de fitoquímicos naturales en la alimentación está en expansión. Los beneficios asociados a los diversos compuestos bioactivos presentes en las frutas y hortalizas han contribuido para aumentar el consumo de estos alimentos en todo el mundo.

Tanto el açai como la jabuticaba se consideran alimentos ricos en antocianinas, ácidos polifenólicos y flavonoides. Estos compuestos están implicados en la prevención de dolencias como arterioesclerosis, artritis, cataratas, inflamaciones crónicas, cáncer y dolencias del sistema inmune. Debido a las múltiples propiedades beneficiosas para la salud de los compuestos polifenólicos, es interesante determinar su cantidad en las dos frutas mencionadas, para así estudiar sus efectos beneficiosos para la salud humana y su posible inclusión en el mercado de alimentos funcionales.

La actividad antioxidante de un alimento es la expresión de los diferentes componentes polifenólicos, cuando se aplica al análisis de alimentos, los métodos son muy diversos, y los resultados obtenidos, también lo son, por lo que sabemos que no existe un ensayo único y específico para la cuantificación de la capacidad antioxidante.

El método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu es el más empleado para la cuantificación de polifenoles totales, pero no es un método específico, la reacción envuelve todos los grupos fenólicos presentes en el medio, además de sustancias reductoras adicionadas a los alimentos o presentes de forma natural, interfiriendo en los resultados.

Muchos estudios no tiene en consideración estas interferencias por lo que las cantidades de polifenoles y su capacidad antioxidante puede haber sido sobreestimada. Por ello, en este estudio se emplea el cartucho C18 para purificar los extractos, y realizar los análisis correspondientes sobre las diferentes fracciones.

Según los análisis realizados tanto el contenido de polifenoles como la actividad antioxidante de açai y jabuticaba se ven afectados por interferentes, dando resultados diferentes en las distintas fracciones analizadas.

Por todo ello, según el presente estudio se hace necesario tener en cuenta los posibles interferentes en la cuantificación de los compuestos antioxidantes y la capacidad de estos en las frutas.

## CONTENIDO

<b>1. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>2</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>2</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>3</b>
<b>5. REVISIÓN TEMA.....</b>	<b>3</b>
5.1. <i>Jabuticaba .....</i>	3
5.2. <i>Açaí .....</i>	4
5.3. <i>Compuestos fenólicos.....</i>	7
5.3.1 <i>Ácido elágico .....</i>	8
5.3.2. <i>Flavonoides.....</i>	8
5.3.3. <i>Antocianinas.....</i>	10
5.4. <i>Determinación de la capacidad antioxidante .....</i>	10
5.4.1. <i>Ensayo DPPH .....</i>	11
5.4.2. <i>Método ABTS.....</i>	11
5.4.3. <i>Método ORAC.....</i>	12
5.4.4. <i>Método FRAP.....</i>	12
<b>6. METODOLOGÍA.....</b>	<b>14</b>
6.1. <i>Obtención de los extractos .....</i>	14
6.1.1 <i>Jabuticaba .....</i>	14
6.1.2 <i>Açaí .....</i>	14
6.2. <i>Eliminación de compuestos no fenólicos .....</i>	14
6.3. <i>Determinación de polifenoles totales.....</i>	15
6.4. <i>Determinación de antocianinas totales.....</i>	15
6.5. <i>Medida de la capacidad antioxidante por el método ABTS.....</i>	16
6.6. <i>Medida de la capacidad antioxidante por el método DPPH .....</i>	16
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>17</b>
7.1. <i>Análisis de antocianinas .....</i>	17
7.2. <i>Análisis de polifenoles totales.....</i>	19
7.3. <i>Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS .....</i>	20
7.4. <i>Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH .....</i>	21

<b>8. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>25</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>30</b>

## 1. JUSTIFICACIÓN

El consumo mundial de fitoquímicos naturales en la alimentación está en expansión. Los beneficios asociados a los diversos compuestos bioactivos presentes en las frutas y hortalizas han contribuido para aumentar el consumo de estos alimentos en todo el mundo (DE PAULA, 2012).

Las frutas son fuente importante de antioxidantes naturales como vitamina C, los carotenoides y los compuestos fenólicos, que están implicados en la prevención de dolencias relacionadas con la formación de radicales libres, como arterioesclerosis, artritis, cataratas, inflamaciones crónicas, cáncer y dolencias del sistema inmune (LAMBERT et al., 2005; VITA, 2005; DWYER et al., 2003; MICHAUD et al., 2000).

Por tanto, la adición de frutas ricas en antioxidantes a la dieta podría contribuir para mejorar el estado de salud general de la población. De modo que las frutas puedan ser una fuente de antioxidantes, y así, se permita la inclusión de estas en el mercado de los alimentos funcionales (DE PAULA, 2012).

El açaí es un alimento con un alto valor nutritivo, ya que presenta un elevado porcentaje de grasas, fibra, vitaminas y minerales (LICHTENTHÄLER et al., 2005; MENEZES et al., 2008; NEIDA y ELBA, 2007; SCHAUSS et al., 2006).

Según algunos estudios el consumo de pulpa o zumo de açaí por personas sanas provocó el aumento considerable de la capacidad antioxidante de su plasma, lo que afianza que el consumo de antioxidantes naturales contribuye a mejorar la salud (SCHAUSS et al. 2006; DEL POZO-INSFRAN et al., 2006; ROCHA et al. 2007; SOUZA et al., 2010).

La jabuticaba es también rica en antocianinas, ácidos polifenólicos y flavonoides, lo que hace que sea un alimento que actúa como antiinflamatorio y contra la actividad citotóxica. El potencial antioxidante del plasma de ratas tratadas con 1% o 2% de cascara de jabuticaba, se vio aumentado (LEITE et al. 2011).

También en micronucleos de ratones se vio la acción anti proliferante debida a la jabuticaba contra tumores celulares (LEITE et al., 2012).

Por eso, se cree que es una fruta con un alto poder para desarrollar alimentos funcionales (RUFINO et al. 2010).

Debido a las múltiples propiedades beneficiosas para la salud de los compuestos polifenólicos, es interesante determinar su cantidad en las dos frutas

mencionadas, para así estudiar sus efectos beneficiosos para la salud humana y su posible inclusión en el mercado de alimentos funcionales.

El método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu es el más empleado para la cuantificación de polifenoles totales. Se basa en la reducción del ácido fosfomolibdico-fosfotúngtico por las hidroxilas fenólicas, produciendo un complejo de coloración azul en medio alcalino. Pero no es un método específico, la reacción envuelve todos los grupos fenólicos presentes en el medio, además de sustancias reductoras adicionadas a los alimentos o presentes de forma natural, interfiriendo en los resultados (ANGELO e JORGE, 2007). El reactivo Folin-Ciocalteu es también capaz de reducir sustancias como el ácido ascórbico, azúcares y algunos aminoácidos (NACZK e SHAHIDI, 2004).

En la década de los 80 se menciona la utilización de este método para la determinación de ácido ascórbico. JAGOTA e DANI (1982), observaron que el ácido ascórbico fue un interferente en la determinación de proteínas por medio de Folin-Ciocalteu, y decidieron utilizar la técnica para la cuantificación del ácido ascórbico. La actuación del ácido ascórbico como reductor, hace posible que pueda ser determinado por el reagente Folin-Ciocalteu, siendo la misma técnica empleada para la determinación de polifenoles totales. También se supo mediante el estudio que el agente Folin-Ciocalteu puede emplearse para la determinación de proteínas.

Muchos estudios no tiene en consideración estas interferencias por lo que las cantidades de polifenoles y su capacidad antioxidante puede haber sido sobreestimada (FERREIRA ,2012).

## **2. HIPÓTESIS**

Compuestos no fenólicos interfieren que en la determinación de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de las frutas açai y jabuticaba.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de fracciones que contienen y no contienen compuestos fenólicos en la determinación de la actividad antioxidante y la cuantificación de fenólicos totales de açai y jabuticaba.

#### 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar el contenido de antocianinas, polifenoles totales y determinar la capacidad antioxidante del extracto inicial de las frutas.
- Cuantificar el contenido de antocianinas, polifenoles totales y determinar la capacidad antioxidante retenidos en el cartucho de separación c18.
- Evaluar diferentes metodologías para determinar la capacidad antioxidante del extracto inicial de las frutas.

#### 5. REVISIÓN TEMA

##### 5.1. Jabuticaba

La jabuticaba pertenece a la familia de *Myrtaceae*, el árbol crece de forma espontánea en gran parte de Brasil. El fruto es una baya en forma de globo de hasta 3cm de diámetro, tiene una cáscara rojiza casi negra, la pulpa es agri dulce muy sabrosa, y suele tener una semilla aunque puede contener hasta cuatro.

Se puede consumir de forma natural o en grajeas. Su cáscara es astringente, permitiendo su uso contra diarreas e irritaciones de la piel.

Pese a que la jabuticaba es popular en todo el país, no tiene un valor comercial muy alto, debido a su carácter perecedero, aunque su venta está asegurada. Tan sólo tiene una vida útil de tres días después de ser recolectada lo que dificulta su comercialización (DE JESUS et al., 2008).

La parte comestible de la fruta supone 23-38%, la cual se compone de 796 g/kg de agua, 40 g/kg de proteínas, 48 g/kg de carbohidratos y 27 g/kg de grasas. La pulpa es rica en vitamina C (2,3 g/ kg de fruta) y minerales, calcio y potasio en mayor proporción (LETERME et al., 2006; TACO, 2006; INCAP/ICNND, 1961). Además tiene un alto contenido de antioxidantes. La jabuticaba contiene taninos y antocianinas, como cianidina-3-glucosídica, peonidina-3-glucosídica y derivados de aglicona (MORTON, 1987; EINBOND et al., 2004; TREVISAN et al., 1972).

Según VIEIRA et al. (2012), la fruta y la piel de jabuticaba contienen 114 y 32,15 g GAE/kg de compuestos fenólicos respectivamente.

Los datos recientes muestran que la principal contribución a los contenidos fenólicos totales de la fruta entera de M. jabuticaba provienen de la cáscara (ABE et al., 2012).

El contenido de antocianinas monoméricas en la piel de la jabuticaba Sabará fue de 205 a 66 veces mayor que el encontrado en la pulpa y las semillas, respectivamente.

La cantidad de cianidina 3-glucósido que se encuentre en el polvo liofilizado de jabuticaba ( $1514,82 \pm 45,51$  mg 100 g<sup>-1</sup>) fue expresiva (LIMA et al., 2011).

El contenido de antocianinas totales, determinada por HPLC fue 2598,32 mg 100 g<sup>-1</sup> de polvo liofilizado de jabuticaba; LCESI-MS/MS y el análisis confirmó la identidad de los compuestos. Cianidina-3-Oglucosídica era la antocianina dominante con el 75,6% sobre las antocianinas totales ( $1963,57 \pm 52,72$  mg 100 g<sup>-1</sup>). Delfinidina 3-O-glucósido representaba  $634,75 \pm 1,83$  mg 100 g<sup>-1</sup> de la jabuticaba liofilizado (LEITE et al., 2011). REYNERTSON et al. (2006) identificaron cianidina 3-glucósido y peonidin 3-glucósido en la fruta. La literatura científica apoya los datos actuales, cianidina y delfinidina 3-glucósidos han sido ya descritos en la fruta y la cáscara de *M. cauliflora* jabuticaba (ABE et al, 2012.; LIMA et al, 2011.; SANTOS et al., 2010).

## 5.2. Açaí

Açaí (*Euterpe oleracea*) pertenece a la familia Arecaceae (palm tree). La palmera crece de forma natural en la región amazónica de Brasil (STRUDWICK & SOBEL, 1988). La recolección del fruto normalmente se da en los meses secos de agosto a diciembre (LICHTENTHÄLER et al., 2005). El fruto de açaí presenta forma globosa, coloración verde que pasa a ser morado oscuro al madurar y tiene un diámetro de 1,1 cm aproximadamente; es consumido en variedad de bebidas y es empleado como ingrediente en la preparación de alimentos por las poblaciones nativas del Amazonas en países como Brasil, Venezuela, Ecuador, Surinam y Colombia (DOS SANTOS et al., 2008). El fruto de açaí es un producto cuyo mercado mundial está en pleno crecimiento, comercializándose en los mercados de Estados Unidos, Europa, Japón y Brasil como mayor productor y exportador (PACHECO et al., 2007).

Recientemente, se ha prestado mucha atención a la capacidad antioxidante del açaí y su posible papel como “alimento funcional”; siendo muy apreciado por su alto contenido de pigmentos tipo antocianina, especialmente la cianidina 3-glucosídica, que se acumula en los frutos y le imparte una gama de colores que van desde el rojo hasta el púrpura (HOGAN et al., 2010; COISSON et al., 2005; SIRÓ et al., 2008; RUFINO et al., 2011).

El alto contenido de compuestos polifenólicos ubican el açaí como una de las cinco frutas con mayor potencial antioxidante, medido por ORAC (1.027 micromol TE/g) (SCHAUSS et al., 2006A); por lo cual se le imparten diversas propiedades antiinflamatorias y farmacológicas asociadas a enfermedades producidas por especies reactivas de oxígeno (ERO's) inductoras de leucemia, y cáncer de colon, entre otras (KANG et al., 2011; DEL POZO et al., 2006; PACHECO et al., 2008).



Su capacidad antioxidante fue estudiada en humanos, animales y cultivos de células (DEL et al., 2006; JENSEN et al., 2009; JENSEN et al., 2008; SPADA et al., 2009).

Desde que la gran capacidad antioxidante del açai fue descubierta numerosas investigaciones se han centrado en análisis y evaluaciones de la capacidad antioxidante de la pulpa de açai, zumo o extracto de este (HONZEL et al., 2008; RUFINO et al., 2009; SCHAUSS et al., 2009; SCHAUSS et al., 2006a; WU et al., 2004).

Los polifenoles han sido asociados con la capacidad antioxidante en frutas y verduras. La mayor parte de compuestos polifenólicos encontrados en el açai son antocianinas, antocianidinas, otros flavonoides y ligninas, etc. (GALLORI et al., 2004; SCHAUSS et al., 2006b). Tanto las antocianinas como las antocianidinas son considerados como los polifenoles con mayor poder antioxidante en las frutas, pero sus concentraciones son relativamente bajas en el açai (SCHAUSS et al., 2006b). Se considera que las antocianinas aportan sólo el 10% de la capacidad antioxidante total del açai (LICHTENTHÄLER et al., 2005). Los flavonoides han sido encontrados en la mayoría de polifenoles del açai (GALLORI et al., 2004; SCHAUSS et al., 2006b). Estos poseen una gran capacidad antioxidante y propiedades antiinflamatoria según algunos estudios (BEARA et al., 2009; LEONG et al., 2010; LI et al., 2009).

Sin embargo, muy pocos estudios han determinado la capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos individualmente encontrados en la pulpa del açai (CHIN et al., 2008).

En los frutos de açai colombiano (*Euterpe oleracea* Mart.), el contenido de fenoles totales es 3.172,3 mg de ácido gálico/ 100 g de liofilizado y de antocianinas totales es  $268 \pm 11,5$  mg de Cianidina 3- glucósido/ 100 g de liofilizado (ROJANO et al., 2011). En otro estudio se encontraron extractos hidroalcohólicos de açai brasileño, 50 mg de Cianidina 3- glucósido/100 g de pulpa seca (GALLORI et al., 2004). Los valores hallados por SANABRIA Y SANGRONIS (2007) para antocianinas y fenoles totales de açai venezolanos son mucho menores. De igual manera, BOBBIO et al. (2000), recogieron 263 mg de Cianidina 3- glucósido/ 100 g de pulpa seca.

Según LICHTENTHÄLER et al. (2005), cianidina 3-O-glucosido y cianidina 3-O-ruteinosa son las antocianinas mayoritarias en el açai deshidratado. Peonidina 3-O-ruteinosa fue encontrado como un componente minoritario en la muestra. También encontraron principalmente cianidina 3-O-glucósido y cianidina 3-O-rutinósido, y en menores cantidades cianidina 3-O-sambubiosido, peonidina 3-O-glucósido, peonidina y 3-O-rutinósido, según SCHAUSS et al. (2006a).

DEL POZO-INSFRÁN et al. (2004) encontraron pelargonidina 3-O-glucósido como antocianina principal de açai, además de cianidina 3-O-glucósido.

En la etapa intermedia de madurez principalmente sólo se encuentran las antocianinas cianidina 3-O-glucósido y 3-O-rutinósido. Peonidina 3-O-glucosido, peonidina 3-O-rutinósido y pelargonidina 3-O-glucosido también fueron

inidentificadas pero en menor cantidad. En el açaí inmaduro no se detectó cianidina 3-Osambubiosido ni antocianinas monoméricas (GORDON et al., 2012), de modo que las concentraciones de antocianinas aumenta con la madurez del açaí, al igual que en otras muchas especies de plantas (BUREAU et al., 2009).

La palma naidi, nombre que se le da al açaí en Colombia, es rica en ácidos fenólicos tipo cinámico, especialmente: ferúlico  $25,00 \pm 1,06$  mg, caféico  $17,04 \pm 2,05$  mg, p-coumárico  $6,73 \pm 0,03$  mg y menor cantidad clorogénico  $0,73 \pm 0,05$  mg, todos estos resultados para 100g de liofilizado de açaí, los cuales contribuyen a la capacidad antioxidante de este (ROJANO et al., 2011). Estos resultados concuerdan con los de DEL POZO-INSFRAN et al. (2006), quienes identifican diversos compuestos fenólicos para pulpas de açaí brasileiro con valores entre 4 a 212mg/L, y el más abundante de igual manera es el ácido ferúlico.

Se identificaron ácidos fenólicos y derivados de estos: ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico, y ácido siríntrico. Excepto el ácido p-coumárico, todos estuvieron presentes en todos los momentos de la maduración, en diferentes cantidades. Las mayores concentraciones se encontraron en el açaí inmaduro, vanílico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido siríntrico fueron cuantitativamente los ácidos fenólicos más dominantes (GORDON et al., 2012).

Resultados similares se encuentran en estudios realizados por DRAGOVIC-UZELAC et al. (2007) y GRUZ et al. (2011).

En total ocho flavonas y un flavonol fueron encontrados en el açaí, todos ellos aparecen en todos los estadios de maduración en diferentes cantidades. Estos son orientina, homoorientina, luteolina-7-O glucosida, vitaxina, isovitexin, chrysoeriol 7-O glucósido, taxifolina, luteolina y chrysoeriol (GORDON et al., 2012). Homoorientin, orientina e isovitexin fueron encontrados ya por SCHAUSS et al. (2006b). Además, KANG et al. (2010) identificaron vitexina, luteolina, y chrysoeriol como polifenoles abundantes en pulpa de acai. No hay informes anteriores sobre 7-O-glucósidos de luteolina y chrysoeriol como componentes de açaí. Informes anteriores se basan sólo en la aparición de derivados de taxifolina (PACHECO-PALENCIA et al, 2009; SCHAUSS et al, 2006b).

Las cantidades de todas las flavonas y taxifolina disminuyeron constantemente durante la maduración. C-glucosídicos derivados de luteolina (homoorientin, orientina) y apigenina (isovitexin, vitexina) fueron dominante en las tres etapas de maduración, seguido de luteolina y chrysoeriol, taxifolina, y los 7-O-glucósidos de luteolina y chrysoeriol. Especialmente en el açaí inmaduro, orientina y homoorientina aparecieron unas concentraciones extraordinariamente altas de 109 y 67,1 mg/100 g materia seca, mostrando de 3 a 4 veces más cantidades en comparación con otros ingredientes polifenólicos

(GORDON et al., 2012). Además, en otro informe, homoorientina, orientina, e isovitexin aparecieron como las concentraciones más altas de polifenoles no antocianicos en açai maduro (PACHECO-PALENCIA et al., 2009).

### 5.3. Compuestos fenólicos

Son producidos por fruta y vegetales como respuesta al ataque de insectos, radiaciones UV, temperaturas extremas, y al estrés mecánico (NACZK e SHAHIDI, 2004; SAIGNE-SOULARD et al., 2006).

Se caracterizan por la presencia de uno o más anillos aromáticos hidroxilados. La fenilamina es el principal precursor de los compuestos fenólicos, los cuales pueden seguir la vía del malonato y/o la vía del shikimato. La enzima fenilalanina-amonio liasa (PAL) es la catalizadora de la reacción de biosíntesis, la cual transforma la fenilalanina en ácido cinámico a partir del cual se forman los polifenoles (SAIGNE-SOULARD et al., 2006).

La relación de los polifenoles con la reducción de algunas dolencias depende del potencial antioxidante que estos presenten, y este a su vez está relacionado con la presencia del grupo hidroxilo en su estructura. Este grupo hidroxilo actúa cediendo un hidrogeno y un electrón al radical libre, de forma que es neutralizado (ELISIA et al., 2007).

Los compuesto fenólicos actúan sobre el metabolismo lipídico de modo que reducen la hipercolesterolemia. Uno de los mecanismos es el aumento de secreción de sales biliares en las heces, otro, es la reducción de la absorción del colesterol por el intestino y otro sería el incremento de la actividad de lipasas pancreáticas, una enzima relacionada con la degradación de triglicéridos (REHRAH et al., 2007).

El mecanismo hipocolesterolémico de los compuestos fenólicos puede actuar sobre enzimas como la colesterol esterasa, que hidroliza ester de colesterol en el lumen intestinal, colesterol-7- $\alpha$ -hidrolasa, responsable de la degradación del colesterol y síntesis de ácidos biliares, ACAT, que llevan a cabo la esterificación y almacenamiento intracelular del colesterol, y HMG-CoA reductasa, enzima limitante de la síntesis endógena de colesterol (MARTINELLO, 2006). Según algunos estudios los compuestos fenólicos pueden incrementar la disminución de los niveles de colesterol por medio de la modulación hepática de los niveles de HMG-CoA, aumento de las sales biliares e incremento de la rotatividad de las tasas de colesterol entre la sangre y el hígado (MOLLACE et al. 2011).

### 5.3.1 Ácido elágico

Pertenece al grupo de los taninos hidroxilables, se forma a partir de una hidroxila ácida y una básica, elagitanino. Puede ocurrir de forma libre, conjunta o glicosilada. Los elagitaninos son ésteres de glicosa o de ácido hexahidroxildifenico, este último después de una hidrólisis se lactoniza espontáneamente y forma el ácido elágico (LANDETE, 2011).

La capacidad antioxidante del ácido elágico depende de su estructura. El grupo hidroxilo es el responsable de ceder átomos de hidrógeno de modo que la capacidad antioxidante es mayor cuanto mayor es el grado de hidroxilación y disminuye conforme aumenta el grado de glicosilación (LANDETE, 2011).

Dependiendo de la matriz del alimento y del tratamiento aplicado, la cantidad de ácido elágico presente en los vegetales varía, esto puede suponer un problema para la biodisponibilidad del compuesto. Se sabe que ese contenido es generalmente bajo, se presenta generalmente en forma de elagitaninos (HAKKINEN et al., 2000; PINTO et al., 2008).

La estructura del ácido elágico no está totalmente estudiada. Según muchos estudios este no fue detectado en la corriente sanguínea después del consumo de alimentos que contenían el compuesto. Esto sugiere que la microflora intestinal metaboliza el ácido elágico produciendo compuestos de interés, como las urolitinas según algunos estudios (SELMA et al., 2009; SHARMA et al., 2010). De modo que la actividad fisiológica está más relacionada con la acción de la microflora intestinal y no tanto con el compuesto inicial. Aunque no se sabe si la producción de los metabolitos es debido al pH del intestino o a la microflora de este, el fin es producir sustancias más asimilables por el organismo (LARROSA et al., 2010).

Las urolitinas pueden inhibir la proliferación de células cancerígenas de colon y pueden regular algunos procesos por los que se desarrolla (LARROSA et al., 2006; GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2009). Además también reducen la cantidad de marcadores inflamatorios en las mucosas del colon, entre los cuales están el óxido nítrico sintetasa, la ciclooxygenasa-2, la prostaglandina sintetasa E y la prostaglandina E2 (LARROSA et al., 2010).

También el ácido elágico está siendo asociado como importante antiinflamatorio, antiaterogénico y antimicrobiano (MULLEN et al., 2002; AVIRAM et al., 2004; SEERAM et al., 2005; YU et al., 2005).

### 5.3.2. Flavonoides

Dependiendo de su potencial reductor los flavonoides eliminan radicales libres, de forma que protegen el cuerpo de posibles reacciones de oxidación (ROUTRAY e ORSAT, 2012). La capacidad antioxidante se debe al carácter lipofílico, lo que

permite que los flavonoides interaccionen con las biomembranas (BARREIROS e DAVID, 2006). Esto suele ocurrir en las agliconas, ya que no contienen azúcares y estos contribuyen a la polaridad haciendo más difícil la interacción con las membranas de las células. Así los flavonoides asimilados por las células, modifican la fluidez lo que impide la difusión de las especies reactivas con el oxígeno y nitrógeno, reduciendo la velocidad de reacciones oxidativa (BARREIROS e DAVID, 2006).

Ya que la generación del cáncer está relacionada con la presencia de radicales libres, y los flavonoides contribuyen a su eliminación, la ingesta de alimentos que contienen flavonoides reducen la posibilidad de contraer cáncer (TIWARI, 2004).

Según un estudio, en ratones con cáncer de mama inducido, el efecto de la quercetina incremento el poder de la doxorrubicina, la cual se emplea en tratamiento de cáncer, al ser ambos empleados de forma conjunta. De modo que los tumores remitieron y disminuyó el desarrollo de la metástasis (DU et al., 2010).

La quercetina es capaz de alterar la morfología e inducir la muerte celular de carcinomas gástricos humanos, esto se puede deber a una alteración en el sistema mitocondrial de la célula tumoral, produciendo una pérdida de energía (WANG et al. 2012). La quercetina es capaz de destruir células leucémicas, células de tumores pancreáticos, de cáncer de mama o de próstata (LEE et al., 2002; KAWAHARA et al., 2009; YUAN et al., 2010).

Según un estudio la quercetina y la ruteina inhiben el estrés oxidativo producido por radicales hidroxila y peroxila en células HepG2 de hígado humano. La quercetina se difunde de forma más fácil en las membranas celulares que la ruteina, por lo que es más eficiente en la inhibición del estrés oxidativo producido por las estructuras citadas. La quercetina es menos polar por lo que atraviesa de forma más fácil las membranas de las células (KIM et al., 2011).

Los flavonoides también pueden prevenir del cáncer por la estimulación de la excreción de sustancias xenobioticas e intermediarias (YANG et al., 2001).

Además los flavonoides también actúan como antiinflamatorios, ya que inhiben lipoxigenasas y ciclooxigenasas, que son enzimas que catalizan la formación de prostaglandinas y leucotrienos, que son mediadores en inflamaciones agudas y lesiones de tejidos (BASTOS et al., 2009).

Puede ejercer acción antitrombótica, ya que tienen la capacidad de unirse a la membrana de las plaquetas y eliminar los radicales libres, restableciendo la biosíntesis y acción de la prostaciclina endotelial y el factor de relajación del endotelio, que se inhiben por los radicales libres (COSTA y ROSA, 2010).

La quercetina está relacionada con la reducción del colesterol total y en fracciones, así como de triglicéridos. Un estudio evaluó el efecto frente a la hipercolesterolemia de camu-camu en contraste con quercetina pura.

### 5.3.3. Antocianinas

Las antocianinas están constituidas por una parte glicosídica, una aglicona (antocianidina) y generalmente por un ácido orgánico. En los vegetales generalmente las antocianinas están glicosiladas lo que estabiliza la molécula (FRANCIS, 2000).

Las antocianinas pueden actuar inhibiendo algunas enfermedades cardiovasculares según algunos estudios (MIRMIRAN et al., 2009; RIBEIRO et al., 2011). Pueden impedir la oxidación de la LDL (lipoproteína de baja densidad), reduciendo la incidencia de arterioesclerosis. La LDL oxidada es absorbida por los macrófagos fácilmente, creando así células esponjosas que dan lugar a placas arterioescleróticas al crecer, produciendo obstrucciones en los vasos sanguíneos e impidiendo la circulación sanguínea hasta los tejidos (TIWARI, 2004).

Las antocianinas están relacionadas con la reducción de hiperglicemia, aunque los estudios no son del todo aclaratorios, se sugiere que los compuestos fenólicos, en mayor medida las antocianinas pueden ser efectivas en el desarrollo de la diabetes Mellitus (MATSUI et al., 2001; SONG et al., 2005; GONÇALVES et al., 2010).

Las antocianinas son inhibidoras de  $\alpha$ -glucosidasa (MCDOUGALL e STEWART 2005), además de una alta capacidad antioxidante, poseen también propiedades antidiabéticas (KWON et al., 2006 e APOSTOLIDIS et al., 2006).

### 5.4. Determinación de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante de un alimento es la expresión de los diferentes componentes polifenólicos, los cuales se comportan mediante diferentes mecanismos de acción reductora en sus interacciones con las especies reactivas de oxígeno (EROs). Los métodos ABTS, FRAP y DPPH actúan mediante mecanismos de transferencias de electrones SET (Single Electron Transfer), además se realizan en varios medios y a diferentes pH (ROJANO et al., 2011).

El ensayo ABTS se basa en la generación de una azul / verde ABTS<sup>+</sup> que se puede reducir por antioxidantes, mientras que el ensayo de DPPH se basa en la reducción del púrpura DPPH a la hidrazina 1,1-difenil-2-picrilo. Ambos ensayos son convenientes en su aplicación y por lo tanto muy populares; sin embargo, son limitadas, ya que no utilizan radicales fisiológicos (GORINSTEIN et al., 2010; KIM et al., 2003; PELLEGRINI et al., 2003; SAMANIEGO SÁNCHEZ et al., 2007).



### 5.4.1. Ensayo DPPH

El ensayo DPPH es uno de los más ampliamente utilizado para evaluar la actividad antioxidante de los extractos de plantas, alimentos y compuestos individuales, gracias a su estabilidad y su facilidad en la aplicación (KRISHNAIAH et al., 2011). Este ensayo se basa en la medición de la capacidad reductora de antioxidantes hacia el radical DPPH, a través de la resonancia de spin electrónico (EPR) o detección por medición de la disminución de su absorbancia (PRIOR et al., 2005). El radical DPPH es un nitrógeno orgánico estable y disponible comercialmente, que reacciona con compuestos donadores de hidrógeno / electrón y tiene un máximo de absorción UV-Vis dentro de la gama de 515-520nm. Tras la reducción, la solución se convierte en radical descolorida de acuerdo con el número de pares de electrones, y el progreso de la reacción está convenientemente controlado por un espectrofotómetro (BLOIS, 1958; BRAND-WILLIAMS et al, 1995; GIL et al., 2000). El análisis es simple, sensible y bastante rápido, y sólo necesita un espectrofotómetro UV-Vis, lo que probablemente explica su amplio uso en la detección de antioxidantes. El resultado se expresa normalmente mediante el valor EC50, que se define como la concentración de antioxidante que causa un 50% en la disminución de la absorbancia de DPPH (EKLUND et al., 2005; VILLANO et al., 2005).

### 5.4.2. Método ABTS

Actualmente el método ABTS, ha sido ampliamente usado para materiales biológicos, compuestos puros y extractos de plantas de naturales hidrófila y lipófila. El compuesto ABTS presenta un color azul/verde con un máximo de absorción a 342nm, es muy soluble en agua y químicamente estable (ANTOLOVICH et al. 2002). El radical ABTS<sup>+</sup>, una vez generado por medio de enzimas (peroxidasa, mioglobina) o químicamente (óxido de magensio, persulfato potásico), pasa a presentar nuevas características con el máximo de absorción a 414nm, 645nm, 734nm y 815nm en medio alcohólico (MILLER y RICE-EVANS, 1997).

Este método es el más adecuado para ensayos de compuestos coloridos, como el caso de sustancias ricas en antocianinas, por presentar una absorción máxima en la región de 734nm, reduciendo posible interferencias de compuestos coloridos que absorben en la región del visible y de compuestos resultantes de reacciones secundarias (RE et al. 1999).

El método ABTS utiliza, para testar la actividad antioxidante de Trolox. El Trolox es un análogo hidrosoluble de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), en el cual el grupo fitil (lipofitila) es sustituido por una carboxila simple.

El valor TEAC es determinado por la capacidad de degradación de un antioxidante en relación al Trolox (ARTS, 2003). El valor de TEAC (Capacidad

Antioxidante Equivalente Trolox) es, entonces, definido como la concentración de antioxidante que proporciona el mismo porcentaje de inhibición de Trolox 1mM (RE et al. 1999). Los valores de TEAC proporcionan un método de comparación de actividad antioxidante entre grupos de drogas y productos químicos (MILLER et al. 1993).

### **5.4.3. Método ORAC**

El método ORAC mide la capacidad antioxidante mediante un mecanismo de transferencia de protones HAT (Hydrogen Atom Transfer) es la técnica avalada por el United States Department of Agriculture (USDA), para medir el potencial antioxidante total de alimentos y suplementos nutricionales (ROJANO et al., 2011).

En contraste, el ensayo ORAC detecta cambio químico en una molécula fluorescente causada por un ataque de los radicales libres.

Este ensayo utiliza una fuente de radicales biológicamente relevante y es el único método que mide tanto el tiempo de inhibición como el grado de inhibición para un antioxidante (HUANG, OU, Y PRIOR, 2005). El ensayo ORAC expresa actividad antioxidante relativa a un estándar (Trolox) mientras se mide la oxidación del sustrato fluorescente por hidroxilo y peroxilo radicales generado dentro de la reacción. Se ha modificado recientemente utilizando un sustrato más estable y menos costoso. Este método es superior a otros métodos similares, por dos razones. En primer lugar, el sistema de ensayo ORAC utiliza la técnica area-under-curve (AUC) y por lo tanto combina el tiempo de inhibición y grado de inhibición de los radicales libres por la acción de un antioxidante en una cantidad única. En segundo lugar, pueden ser utilizados diferentes generadores de radicales libres u oxidantes (C'AVAR et al., 2012).

### **5.4.4. Método FRAP**

El ensayo FRAP es diferente de los otros ya que no hay radicales libres involucrados (GORINSTEIN et al., 2010; KIM et al., 2003; PELLEGRINI et al., 2003; SAMANIEGO SANCHEZ et al., 2007).

Se utiliza para evaluar la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el hierro férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) presente en un complejo con la 2,4,6 tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ ), que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm (ROJANO et al., 2011).

El ensayo FRAP es un método simple, rápido y barato, que tiene la capacidad de determinación cuantitativa de la cantidad de antioxidantes en muestras. El ensayo tiene poca selectividad y mide casi todos los reductores (es decir,



antioxidantes) con un potencial de reducción por debajo de 0,7 V, que es el potencial de reducción de la pareja  $\text{Fe}^{3+} + \text{-TPTZ}/\text{Fe}^{2+} + \text{-TPTZ}$  (PRIOR et al., 2005). Las condiciones de ensayo tales como la extracción de disolventes, que promueve la detección tanto en agua y antioxidantes solubles en grasas son elegidos (HALVORSEN y BLOMHOFF, 2002). El ensayo FRAP no detecta el glutatión (GSH) o tioles proteicos. Es una ventaja sobre los ensayos de ORAC y TEAC porque estos tioles, que están presentes en altas concentraciones en los alimentos animales y vegetales, son principalmente degradados en el intestino y se absorben pobremente. Una desventaja del ensayo FRAP es su incapacidad para detectar otros tioles de pequeño peso molecular y moléculas que contienen azufre de, por ejemplo ajo, que pueden desempeñar un papel en la defensa antioxidante. Sobre la base de estas consideraciones, el ensayo FRAP fue seleccionado como el ensayo más adecuado para las mediciones de contenido de antioxidante en un gran número de diferentes elementos comestibles (HALVORSEN y BLOMHOFF, 2011).

Cuando se aplica al análisis de alimentos, las mediciones de la capacidad antioxidante pueden ser diferentes dependiendo del ensayo utilizado (GORINSTEIN et al., 2010; KIM et al., 2003; PELLEGRINI et al., 2003; SAMANIEGO SÁNCHEZ et al., 2007).

OU et al. (2002) realizó un análisis a gran escala sobre vegetales utilizando dos ensayos diferentes in vitro, FRAP y ORAC, y obtuvo capacidades antioxidantes muy diferentes en ambos métodos. En sus estudios la capacidad antioxidantes determinado por los ensayos de FRAP y ORAC tuvieron una débil correlacionado. PELLEGRINI et al. (2003) declararon que las clasificaciones de varias frutas, verduras y bebidas difieren en función de si la medida de la capacidad antioxidante se realiza mediante ensayos de FRAP o ABTS, esto sugiere que se debe tener precaución al interpretar las capacidades antioxidantes de ensayos distintos. GORINSTEIN et al. (2010) descubrió una alta correlación entre el contenido de polifenoles en tres frutas exóticas y su capacidad antioxidante medida por ABTS, DPPH y ensayos de FRAP.

Los hallazgos de un estudio basado en el análisis de un gran número de muestras de alimentos ricos en antioxidantes sugieren que la comparación mediante el ensayo DPPH y el ensayo ABTS estima de la mejor forma la capacidad antioxidante de los alimentos, en particular frutas, verduras y bebidas. Los datos muestran que las capacidades antioxidantes medidas mediante el ensayo ABTS están fuertemente correlacionados con la base de datos de los ensayos ORAC de USDA, fenoles y flavonoides contenidos en los 50 alimentos más populares ricos en antioxidantes de la dieta de los EE.UU (FLOEGEL et al., 2011).

Los métodos para la medida de la capacidad antioxidante son muy diversos, y los resultados obtenidos, en múltiples estudios sobre alimentos por diversos

ensayos también lo son, por lo que sabemos que no existe un ensayo único y específico para la cuantificación de la capacidad antioxidante.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Obtención de los extractos**

#### **6.1.1 Jabuticaba**

Se pesaron 25g de cáscara de jabuticaba deshidratada y se trituraron con etanol 70% (1:10), después se acidifico adicionando HCL hasta alcanzar un pH=2. La muestra fue almacenada durante 24h a 4+-1°C en ausencia de luz. Después se centrifugo a 2500rev/10min y le muestra fue filtrada a vacío. Por último, se evaporo el solvente en el rotavapor a 45°C con vacío.

#### **6.1.2 Açai**

Se pesaron 50g de pulpa de açai y se adiciono etanol 70% (1:2), se acidifico con HCL hasta alcanzar un pH=2. La muestra fue almacenada durante 24h a 4+-1°C en ausencia de luz. Después fue centrifugada a 2500r/10min y filtrada a vacío. Se evaporo el solvente en el rotavapor a 45°C y con vacío

### **6.2. Eliminación de compuestos no fenólicos**

Mediante el paso del extracto a través de un cartucho de separación C18 (Sep-pak Vac 35cc (10g), Waters), que retiene los polifenoles, dejando pasar el resto de sustancias.

Inicialmente el cartucho se acondicionó con 50ml de metanol acidificado (0,01% de HCl) y 50ml de agua destilada. Después, una alícuota de 10ml de extracto de jabuticaba y 15 ml de extracto de açai diluido (25/5), será vertida en el cartucho de separación. Los interferentes serán recogidos por medio del paso de 100ml de agua destilada por el cartucho, en cuanto que los polifenoles quedaran absorbidos en el mismo. El extracto libre de interferentes, fue recogido con 50ml de metanol (NORATTO et al., 2010). Para que el cartucho blanquease del todo fue necesario pasar metanol acidificado (0,01% de HCl).

### 6.3. Determinación de polifenoles totales

Los análisis de compuestos fenólicos totales fueron realizados según la metodología citada por SINGLETON y ROSSI (1965), utilizando el reagente Folin-Ciocalteu.

Los extractos y las fracciones obtenidas después de ser pasados estos por el cartucho C18 fueron diluidos en 3ml de agente Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada (1:10; v/v); después de 3 minutos en ausencia de luz, fueron adicionados 2,4ml de solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5%; m/v). Después de una hora en ausencia de luz, la absorbancia fue leída por espectrofotometría a una longitud de onda de 760nm. El IPT fue determinado utilizando una curva analítica de ácido gálico (0-200mg/l) y los resultados fueron expresados en ácido gálico equivalente (mg de ácido gálico equivalente (AGE/l)).

### 6.4. Determinación de antocianinas totales

El contenido de antocianinas totales fue determinados por espectrofotometría de acuerdo con LEES y FRANCIS (1972).

Los extractos y fracciones recogidas del cartucho fueron diluidos con etanol:HCl (1,5mol/l) en la proporción 85:15 (v/v). Después de la dilución se realizó la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 535nm. La dilución fue adaptada de tal modo que se obtuviese una lectura de la absorbancia entre 0,200-0,800, respetando la Ley de Lambert-Beer. El contenido de antocianinas se obtuvo por la ecuación:

$$A = \epsilon_{1\text{cm}} \cdot b \cdot C'$$

Donde:

A= Absorbancia (Abs) en 535nm

$\epsilon_{1\text{cm}}$ = Coeficiente de absorción ( $98,2 \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )

C'= Concentración (g/L)

b= Espesura de la cubeta (1cm)

El contenido total e antocianinas fue expresado en mg de antocianinas/100g de cascara o pulpa. Fue utilizado el Coeficiente de Extinción glucosídeo medio ( $\epsilon_{535\text{nm}}^{1\text{cm}} = 98,2 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ), que corresponde a cianindina-3-glucosídeo (FULEKI e FRANCIS, 1968).

## **6.5. Medida de la capacidad antioxidante por el método ABTS**

Se basa en el método desarrollado por MILLER et al. (1993) con modificaciones segundo protocolo establecido en el laboratorio de Pigmentos y Compuestos Bioactivos del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Federal de Viçosa (DTA/UFV/Brasil).

El radical  $ABTS^+$  se obtiene por reacción de 7ml ABTS de solución standard con 145mM de persulfato potásico, mezclándose en ausencia de luz durante 12-16h antes de su uso. La solución  $ABTS^+$  es diluida con etanol hasta lograr una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 734nm. Después se adicionan 500 $\mu$ l de muestra o trolox estándar en 3ml de ABTS diluido, la absorbancia se mide 6 minutos después de la mezcla. Para la calibración se emplean soluciones etanólicas con concentración conocida de trolox y los resultados son expresados en  $\mu$ M trolox/g fruta.

Para expresar los resultados  $\mu$ M equivalente de Trolox/ g de fruta, fue necesario extrapolar en cada una de las gráficas para cada muestra, un valor de absorbancia obtenido de una concentración intermedia en la curva patrón de Trolox.

## **6.6. Medida de la capacidad antioxidante por el método DPPH**

Se emplea el método DPPH modificado (BRAN-WILLIAMS, CUVELIER, & BERSET, 1995) en cual está basado en la cuantificación de la eliminación de radicales libres con modificaciones.

Se prepara una solución de metanol que contenga 0.1mM de DPPH. Después se ajusta el blanco con metanol, a una alícuota de 100  $\mu$ L de extracto de fruta, se la añade 3.9ml de solución de DPPH. El decrecimiento de la absorbancia a 515nm es medido a intervalos de 1min los primeros 10min, y después cada 5min hasta la estabilización.

La capacidad antioxidante es expresada, como la concentración de antioxidante requerido para reducir la cantidad original de radicales libres hasta el 50% (EC50) y el resultado es expresado como g de fruta/g DPPH.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Análisis de antocianinas

El resultado de antocianinas encontradas en la pulpa de açai fue de 62,41mg antocianinas/100g de frutas y 118,66mg antocianinas/100g de fruta en la cáscara de jabuticaba (tabla 1).

Tabla 1- Contenido de antocianinas totales en pulpa de açai y cáscara de jabuticaba.

Fruta <sup>a</sup>	Extracto <sup>b</sup>	Fracción C18 <sup>c</sup>
Açai	62,41±3,84	43,44±16,02
Jabuticaba	118,66±2,41	80,41±4,85

<sup>a</sup> Pulpa de açai (bae húmeda) y cáscara de jabuticaba (base seca)

<sup>b</sup> Extracto que contiene compuestos fenólicos e interferentes.

<sup>c</sup> Fracción de extracto que contiene sólo compuestos fenólicos

<sup>bc</sup> Los resultados corresponden a mg antocianinas/ 100g de fruta, siendo expresados como media±desvío patrón

Según DOS SANTOS et al. (2008), al analizar 12 pulpas de açai se encontraron cantidades que van desde 13,93 a 54,18 mg/100g de producto, todas ellas menores que las obtenidas en este estudio. DE AGUIAR (2011) encontró un resultado próximo también, 58,33mg/ 100g de fruta, siendo este valor el que más se acerca encontrado en el presente estudio. CRUZ (2008) Y MENEZES (2005) hallaron resultados mayores para pulpa de açai, 80,4mg de cianindina 3-glucosídeo/100 g de pulpa y 78,8mg/100 de açai.

El contenido de antocianinas después de pasar la muestra de pulpa de açai por el cartucho C18 fue de 43,44mg/ 100 gramos de pulpa, el 30,39% menos de los polifenoles obtenidos en el fruto bruto.

El contenido de antocianinas en cáscara liofilizada de jabuticaba obtenido en este estudio fue de 118,66mg/100g de fruta (tabla 1), según un estudio (IBRAHIM 2011) en el que se llevaron a cabo lecturas de antocianinas sobre diferentes métodos de extracción se obtuvieron valores que van desde 111,01 hasta 260,73 mg/100 g de cáscara de jabuticaba, resultados próximos a los obtenidos. También en este estudio se obtuvieron valores de antocianinas para pulpa de jabuticaba de 7,5 a 66,13 mg/100 g de fruta. Según AGUIAR 2011 65,28mg/ 100g de cascara de jabuticaba en base húmeda se encontraron en la investigación. Según SILVA et al. (2011) se obtuvieron valores de 111,01mg/ 100g y 239,27mg/ 100g para cascara de jabuticaba fresca.

Se obtuvieron 80,41mg de antocianinas/100g en cascara de jabuticaba una vez purificado el extracto mediante el cartucho C18, este resultado es un 32,23% menor en relación a las antocianinas obtenidas del extracto de sin bruto.

La jabuticaba tiene un mayor contenido de antocianinas, duplicando casi el presente en açai, concretamente un 90,13% más de antocianinas están presentes en la jabuticaba.

Las diferencias en los resultados para una misma fruta obtenidos de la cuantificación de antocianinas se pueden deber a la inestabilidad de estas y por ello su pérdida durante la extracción, a diferentes modos en la colecta de la fruta, a diferentes estados de maduración durante la recogida de la fruta y al modo de transporte. También puede que a diferentes condiciones de cultivo como (temperatura, suelo, índice pluviométrico-lluvias).

Algunos de los resultados comparados son obtenidos sobre base húmeda y otros sobre base seca, lo que hace también que las cantidades de antocianinas encontradas en la fruta sean variables.

El contenido de antocianinas es menor después de pasar la muestra por el cartucho C18, 30,39% en pulpa de açai y 32,23% en cascara de jabuticaba, que el obtenido del extracto sin purificar, esto hace pensar que existen interferentes que afectan a la medida de las antocianinas, sobreestimando el contenido de estas en el fruto bruto. En todo proceso de purificación o aislamiento hay pérdidas. Esa diferencia es mayor debida a las perdidas, pues la medida de las antocianinas totales tiene por base la lectura de absorbancia de antocianina mayoritaria a una longitud de onda específica, no siendo posible, por tanto, cuantificar posibles interferentes.

La antocianina que se encuentra en mayor cantidad en la fruta de açai es cianindin-3-glucosido que corresponde al 95% de las antocianinas (ROJANO et al. 2011). Otra de las antocianinas encontradas en mayor proporción fue cianindin-3-rutinosido (LICHTENTHALER et al. (2005)). Cianindin-3-sambumbidosido, peonidin-3-glucosido y peonidin-3-rutinosido fueron encontrados en menor cantidad (SCHAUSS et al. 2006). Según PACHECO-PALENCIA et al. (2009) se encontraron en mayor cantidad cianindin-3-rutinosido y cianindin-3-glucosido, respectivamente, en la variedad *Euterpe oleracea*, y peonidin-3-rutinosido en menor cantidad. En la variedad *Euterpe precatoria* las antocianinas mayoritarias fueron cianidin-3-rutinosido y pelargonidin-3-glucosido, siendo un compuesto minoritario cianidin-3-sambubiosido.

En la piel de la jabuticaba las antocianinas que se encuentran en mayor proporción son, delpinindin-3-glucosido y cianindin-3-glucosido (VIEIRA et al. 2012).

## 7.2. Análisis de polifenoles totales

Se obtuvieron 625,88mg de polifenoles totales/100g de pulpa de açai y 460,44mg de polifenoles totales/100g de cáscara de jabuticaba (tabla 2).

Tabla 2- Contenido de polifenoles totales en pulpa de açai y cáscara de jabuticaba.

Fruta <sup>a</sup>	Extracto <sup>b</sup>	Extracto C18 <sup>c</sup>
Açai	625,88±35,18	427,17±111,13
Jabuticaba	460,44±37,81	391,06±35,06

<sup>a</sup> Pulpa de açai (bae húmeda) y cáscara de jabuticaba (base seca)

<sup>b</sup> Extracto que contiene compuestos fenólicos e interferentes.

<sup>c</sup> Fracción de extracto que contiene sólo compuestos fenólicos

<sup>bc</sup> Los resultados corresponden a mg polifenoles totales/ 100g de fruta, siendo expresados como media±desvío patrón

Fue superior el valor encontrado por FERREIRA (2011) en pulpa de açai para contenido de polifenoles totales 576,0mg/ 100g de fruta.

Después de pasar el extracto por el cartucho C18 se obtuvieron 427,17mg de polifenoles/100g de fruta (tabla 2), 31,75% menos que en la fruta bruta.

En la cáscara de la jabuticaba el resultado obtenido fue 460,44mg polifenoles/ 100g de fruta (tabla 2), un valor próximo fue encontrado en el estudio de FERREIRA (2011) que obtuvo 455,72mg de polifenoles/ 100g de fruta. IBRAHIM (2011) obtuvo contenidos de polifenoles para cáscara de jabuticaba por diferentes métodos de extracción que van desde 404,02 hasta 1916,98 mg GAE/100 g fruta, y de 185,92 a 703,17mg GAE/100 g de fruta, lo que enfatiza la influencia de las condiciones utilizadas durante la extracción de compuestos fenólicos.

Al ser pasada la muestra por el cartucho C18 se obtuvo un 15,07% menos de polifenoles, 391,06mg/100g de fruta (tabla 2).

Ambas frutas tienen contenidos similares de polifenoles totales, siendo algo mayor los presentes en el açai.

El contenido de antocianinas de camu-camu fue menor después de pasar el extracto por el cartucho C18, según FERREIRA (2012) se obtuvieron un 17 y un 20% menos en muestras de camu-camu recogidas de cultivos secos e inundados respectivamente. Los resultados obtenidos en este trabajo después de purificar

el extracto fueron un 31,75 y 15,07% menor de contenido polifenolico en pulpa de açai y cascara de jabuticaba respectivamente. La diferencia puede ser debida a que los resultados son obtenidos de diferentes frutas y por tanto la cantidad de interferentes que estas contiene puede variar de unas a otras.

### 7.3. Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS

El resultado del análisis ABTS para determinar la capacidad antioxidante de la pulpa de açai fue 22,8µm TEAC/ g de fruta y para la cáscara de jabuticaba 115,788µm TEAC/ g de fruta.

Tabla 3- Cuantificación de la capacidad antioxidante por el método ABTS en pulpa de açai y cáscara de jabuticaba.

Fruta <sup>a</sup>	Extracto <sup>b</sup>	Extracto C18 <sup>c</sup>
Açai	22,81±5,09	16,13±1,03
Jabuticaba	115,78±9,24	132,93±30,38

<sup>a</sup> Pulpa de açai (bae humeda) y cáscara de jabuticaba (base seca)

<sup>b</sup> Extracto que contiene compuestos fenólicos e inerferentes.

<sup>c</sup> Fracción de extracto que contiene sólo compuestos fenólicos

<sup>bc</sup> Los resultados corresponden a MMtrolox/ g de fruta, siendo expresados como media±desvio patrón.

Se obtuvieron valores de actividad antioxidante de açai entre 10,21-52,47µm TEAC/ g de fruta, para pulpas comerciales (MATIAS et al. 2008). Según otro estudio la actividad antioxidante del açai es de 15,1±4,1µm TEAC/ g de fruta (RUFINO 2010). Las diferencias entra estos valores se pueden deber a diferentes estados de maduración de las frutas durante su recolección, diferencias de transporte, practicas de cultivo, etc.

Después de ser pasada la muestra por el cartucho C18 la actividad antioxidante fue de 16,13µm TEAC/ g de fruta, un 29,26% menor que en el fruto bruto.

La actividad antioxidante de la jabuticaba es de 115,78µM TEAC/ g de fruta. Se obtuvieron valores superiores de entre 216,78 a 703,17µM TEAC/g de pulpa de



jabuticaba utilizando diferentes disolventes para la extracción (IBRAHIM 2011). Los solventes empleados fueron etanol, metanol y acetona, siendo los valores más próximos al obtenido en este trabajo los resultantes del extracto etanólico, que van desde 216,87 a 473,29  $\mu\text{M}$  TEAC/g de pulpa.

La actividad antioxidante después de pasar el extracto por el cartucho C18 fue 132,93  $\mu\text{M}$  TEAC/ g de fruta, lo que supone un 14,81% más que los resultados obtenidos de la fruta bruta. Esto se puede deber a que se eliminan interferentes mediante la purificación del extracto por medio del cartucho C18, y estos interferentes eventualmente pueden enmascarar la actividad antioxidante de los compuestos haciendo que esta sea menor en el extracto bruto. Aunque en este caso hubo una gran diferencia entre las repeticiones, tal vez los valores no sea estadísticamente diferentes.

#### 7.4. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

La capacidad secuestrante del extracto de açai fue 75,30%, y 74,92% para la cáscara de jabuticaba.

Tabla 4- Cuantificación de la actividad antioxidante por el método DPPH en pulpa de açai y cáscara de jabuticaba.

Fruta	Extracto*	Cartucho C18*
Açai	75,30 $\pm$ 2,22	57,91 $\pm$ 1,31
Jabuticaba	74,92 $\pm$ 9,13	41,74 $\pm$ 3,54

<sup>a</sup> Pulpa de açai (bae húmeda) y cáscara de jabuticaba (base seca)

<sup>b</sup> Extracto que contiene compuestos fenólicos e interferentes.

<sup>c</sup> Fracción de extracto que contiene sólo compuestos fenólicos

<sup>bc</sup> Los resultados corresponden a % de actividad secuestrante, siendo expresados como media $\pm$ desvío patrón

La capacidad secuestrante del extracto de açai en este estudio fue 75,30%, próximo a los valores obtenidos por DO SOCORRO (2011) para extractos de açai manejado, plantado y nativo, medidos durante los diferentes meses del año en la localidad de Francisco Luiz na Ilha do Pará, 74,51% y 74,48% para el mes de julio y 74,38 para el mes de junio. Siendo los valores más alejados de los obtenidos en este estudio 44,37% y 93,90 % recogidos en los meses de agosto y

marzo. En la localidad de Maracá el valor más próximo fue 76,33% en el mes de junio y las capacidades secuestrantes más alejadas fueron 54,27% y 92,13% en los meses de diciembre y octubre respectivamente. Un 73,21% es el valor más próximo al obtenido en el presente estudio recogido durante el mes de junio en la localidad de Mazagão Novo (Mazagão), 38,44% y 94,67% en los meses de abril y septiembre. Esto enfatiza el efecto de las condiciones de cultivo en la producción de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante.

La actividad antioxidante de la pulpa de açaí fue menor después de pasar el extracto por el cartucho C18, un 57,91%, lo que supone un 23,1% menor que en el fruto bruto.

La actividad antioxidante de la cascara de jabuticaba es 74,92%. Fueron encontrados valores para jabuticabas nativas de 22,19% a 92,15% para extractos realizados con diferentes solventes y porcentajes, y para la cascara valores de 36,65% a 87,52% siendo las medidas también realizadas sobre extractos obtenidos de diferente modo (SCHLLEMER). El resultado obtenido en este estudio se aproxima a valores obtenidos de la fruta entera de 71,36% y 70,02%, y para valores resultantes de la cáscara de 71,82% y 77,14%.

Los valores obtenidos de la cáscara fueron intermedios de 36,65% a 87,52%, siendo 55,33 y 59,15% obtenidos del solvente puro metanol, habiendo sido medida la capacidad antioxidante a 30 y 60 minutos respectivamente. Los resultados del etanol (extractos con diferentes porcentajes de pureza) midiendo la actividad antioxidante a 30 minutos son 36,65-86,54% y a 60 minutos 66,58-87,52%. De la fruta entera se obtuvieron valores para el metanol puro de 39,03% y 70,02% midiendo la actividad antioxidante a 30 y 60 minutos. Los resultados para el extracto etenólico fueron 22,19-90,16%, midiendo la actividad antioxidante después de 30 minutos, para los 60 minutos de reacción se obtuvieron valores de 44,64 a 92,15%.

Fue menor el resultado obtenido después que la muestra fuese pasada por el cartucho de separación, obteniendo 41,74% de actividad secuestrante, un 44,28% menor que el resultado obtenido del extracto bruto.

La actividad antioxidante puede ser menor después de que el extracto sea pasado por el cartucho C18, debido a la eliminación de interferentes que pueden reaccionar como compuestos antioxidantes en el análisis, dando así resultados mayores si el extracto no es purificado.

La actividad secuestrante de la pulpa de açaí y de la cascara de jabuticaba son próximas entre sí. El ensayo DPPH no tiene una buena correlación con la cantidad de antocianinas presente en la fruta, sin embargo el ensayo ABTS sí, por ello de este ensayo se obtuvieron valores más alejados entre ambas frutas (22,81 y 115,81, para açaí y jabuticaba, respectivamente), siendo que en la cuantificación de antocianinas el resultado obtenido para jabuticaba fue muy

superior y de ahí una mayor actividad antioxidante de la jabuticaba medida por el método ABTS.

Tabla 5- Cuantificación de actividad antioxidante por diferentes métodos químicos en pulpa de diferentes rutas (KUSKOSLI et al. 2005).

MUESTRAS	DMPD*	DPPH*		ABTS*	
	TEAC 10min	TEAC 30min	TEAC 60 min	TEAC 1min	TEAC 7min
Mora	3,6±0,2	4,3±0,2	5,9±0,3	6,4±0,8	7,1±0,2
Uva	3,6±0,1	7,0±0,3	8,5±0,5	8,5±0,7	9,2±0,2
Açaí	4,5±0,1	6,9±0,2	8,3±0,1	9,1±0,4	9,4±0,2
Guayaba	4,2±0,1	5,9±0,4	7,4±0,01	7,2±0,8	8,2±0,4
Fresa	4,3±0,0	9,2±0,1	10,5±0,2	11,2±0,2	12,0±0,3
Acerola	46,6±0,7	53,2±5,3	68,0±2,2	66,5±3,1	67,6±0,4
Piña	5,3±0,0	0,5±0,01	0,6±0,1	2,9±0,6	3,4±0,3
Mango	24,3±0,3	12,9±0,2	13,7±0,4	11,8±0,9	13,2±0,3
Graviola	4,8±0,3	2,88±0,2	4,5±1,4	4,3±0,4	4,8±0,3
Cupuaçu	5,1±0,2	0,73±0,2	1,11±0,1	1,7±0,1	2,0±0,1
Maracuya	5,0±0,2	0,9±0,2	1,02±0,4	2,3±0,6	2,7±0,1

\*Medida de actividad antioxidante TEAC: actividad antioxidante equivalente al Trolox ( $\mu\text{mol TE/g}$  peso muestra).

Tabla 6- Cuantificación de la actividad antioxidante por diferentes métodos químicos en 18 frutas tropicales no tradicionales de Brasil (RUFINO et al. 2010).

Frutas	DPPH EC50 (g/g DPPH)	ABTS $\mu\text{mol trolox/g}$	FRAP $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$
Açaí	4264±1381	15,1±4,1	32,1±6,5
Acerola	670±64,5	96,6±6,1	148±16
Bacuri	n.d.	n.d.	n.d.
Cajá	9397±64,8	7,8±0,2	11,8±0,2
Caju	7142±205	11,2±0,04	22,9±0,7
Camu-camu	478±1,2	153±2,6	279±1,5
Carnaúba	3549±184	10,7±0,2	155±0,4
Gurguri	1385±102	35,5±1,6	70,4±7,8
Jabuticaba	1472±16,9	37,5±1,4	87,9±1,9
Jambolao	3025±65,4	29,7±0,3	35,5±1,4
Juçara	1711±46	78,3±13,3	84,9±16,1
Mangaba	3385±349	14,6±1,8	183±1,6
Murici	n.d.	n.d.	n.d.
Murta	936±33,3	49,1±0,2	108±2,3
Puça-caroa-de-frade	1272±51,4	38,5±1,2	84,9±1,3
Puça-preto	414±14,4	125±9,7	208±3,9

Umbu	7074±218	6,3±0,2	17,2±0,3
Uvaia	3247±392	18±0,8	38,4±4,1

Ambas tablas muestran la gran variedad de resultados dependiendo del método empleado para la cuantificación de la capacidad antioxidante, en diferentes frutas.

## 8. CONCLUSIÓN

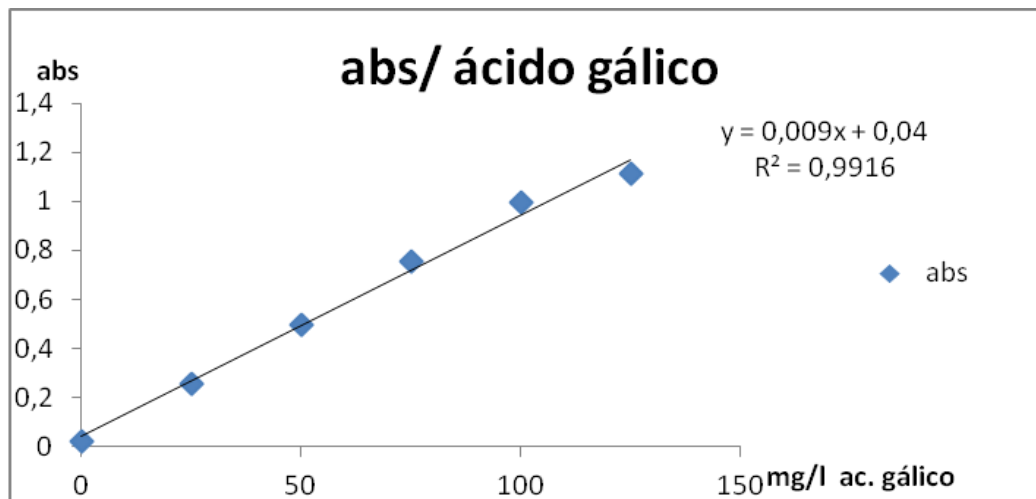
El contenido de polifenoles se ve afectado por interferentes presentes en açai y jabuticaba, dando resultados inferiores después de purificar el extracto.

También la actividad antioxidante se ve afectada por estos interferentes.

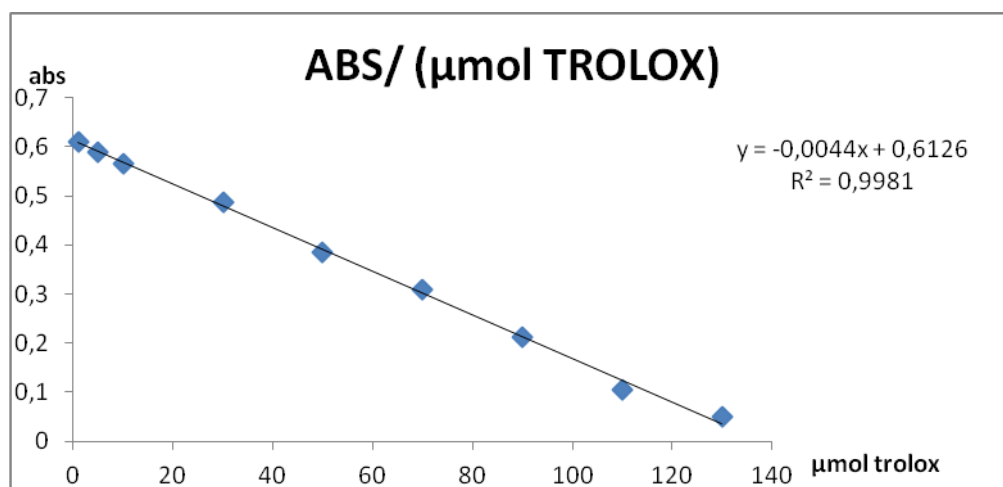
Haciendo que la cuantificación de esta en las frutas, puede ser sobrestimada y en algún caso eventual se puede producir el enmascaramiento por parte de estos interferentes de los compuestos antioxidantes, reduciendo su efecto, pudiendo así, subestimar la actividad antioxidante de las frutas.

Por todo ello, según el presente estudio se hace necesario tener en cuenta los posibles interferentes en la cuantificación de los compuestos antioxidantes y la capacidad de estos en las frutas, para así llevar a cabo una caracterización correcta de las mismas, y que puedan ser aprovechadas al máximo en la industria alimentaria y, posible inmersión en el mercado de los alimentos funcionales.

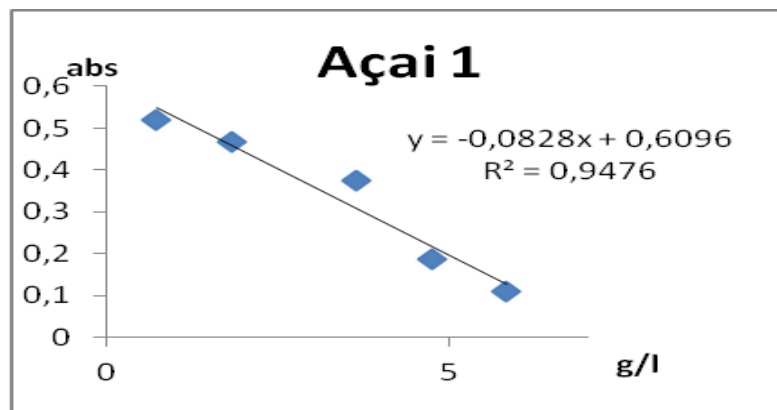
## 9. ANEXOS



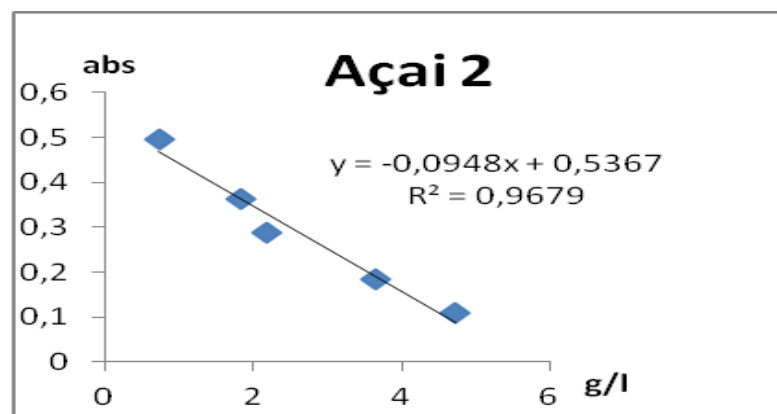
**Figura 1 – Curva de ácido gálico, utilizada como patrón en la determinación de fenoles totales.**



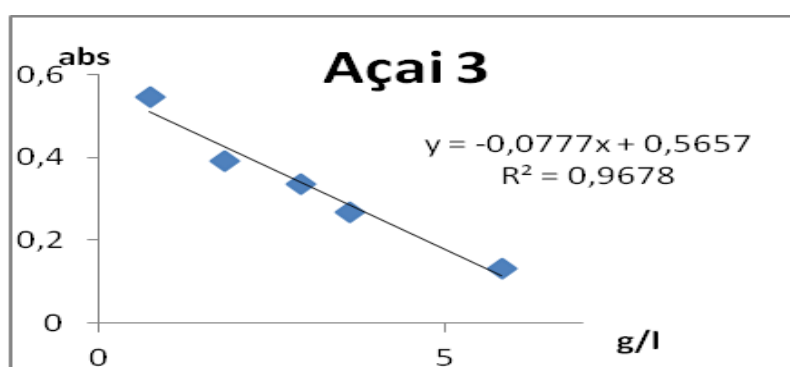
**Figura 2 – Curva de trolox, utilizada como patrón para la determinación de actividad antioxidante por el método ABTS.**



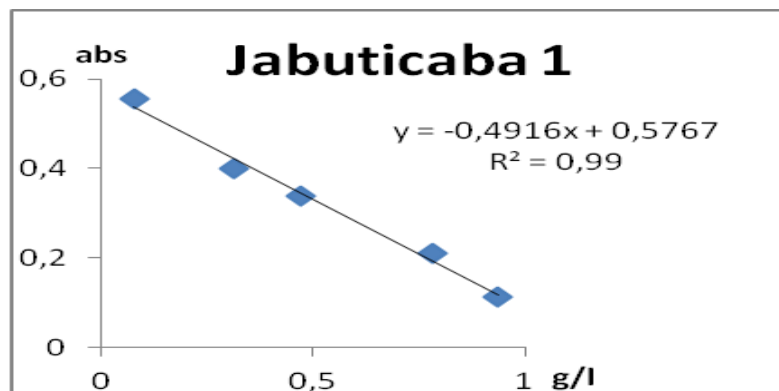
**Figura 3-** Representa la variación de absorvancia frente a la concentración de la repetición 1 del extracto de pulpa de açaí bruto.



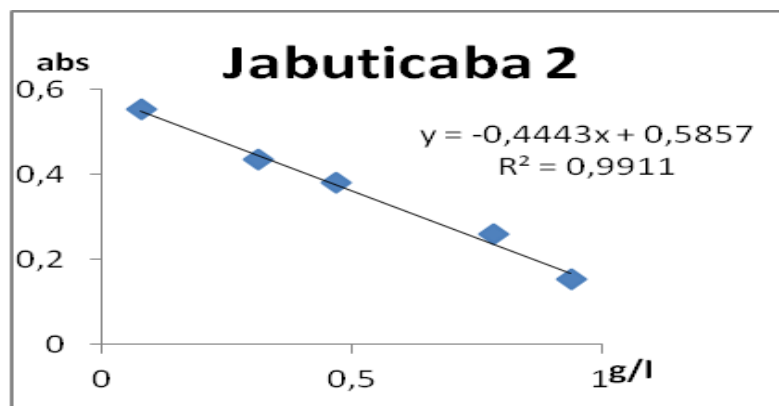
**Figura 4-** Representa la variación de absorvancia frente a la concentración de la repetición 2 del extracto de pulpa de açaí bruto.



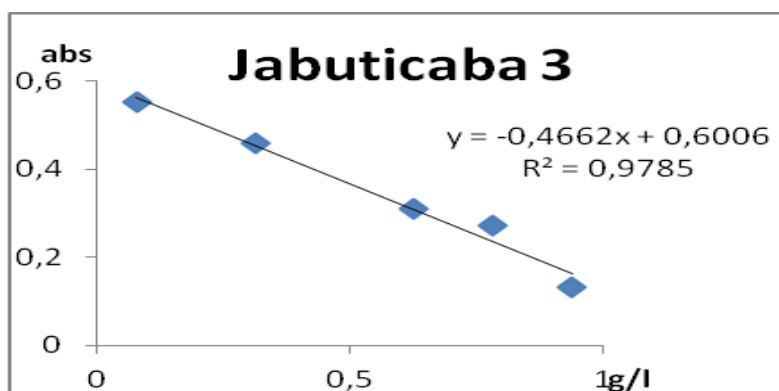
**Figura 5-** Representa la variación de absorvancia frente a la concentración de la repetición 3 del extracto de pulpa de açaí bruto.



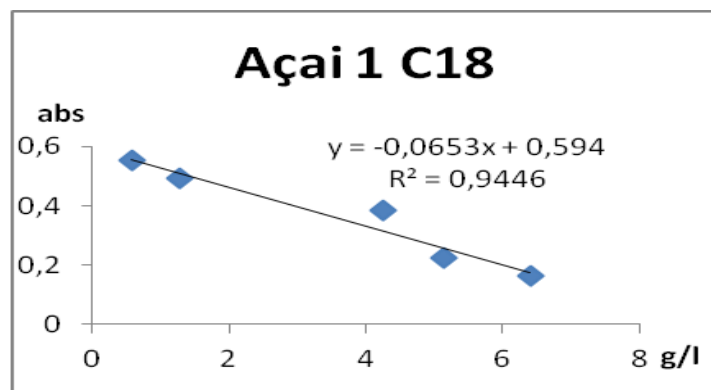
**Figura 6- Representa la variación de absorvancia frente a la concentración de la repetición 1 del extracto de casacara de jabuticaba cbruto.**



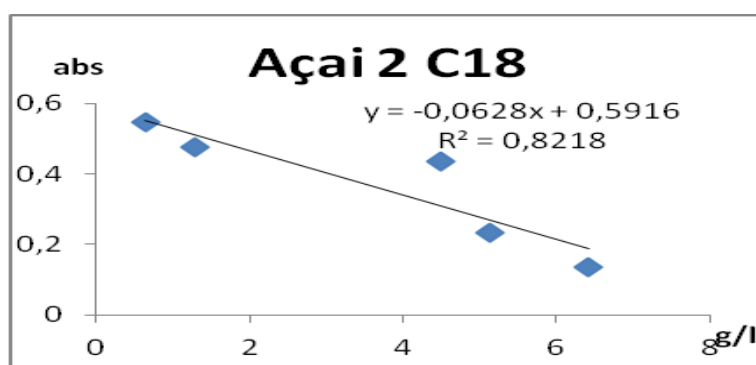
**Figura 7- Representa la variación de absorvancia frente a la concentración de la repetición 2 del extracto de cáscara de jabuticaba bruto.**



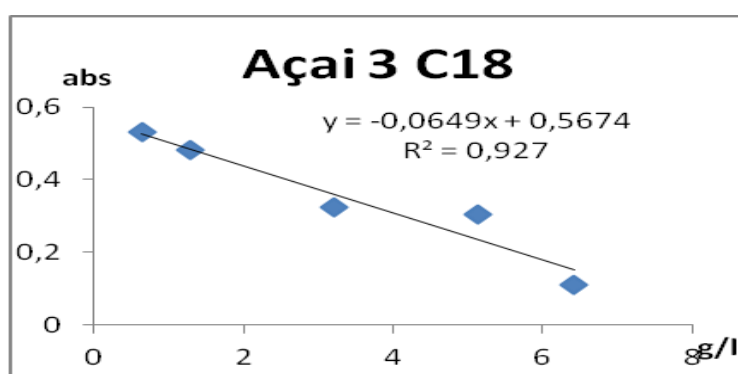
**Figura 8- Representa la variación de absorvancia frente a la concentración de la repetición 3 del extracto de cáscara de jabuticaba bruto.**



**Figura 9-** Representa la variación de absorbancia frente a la concentración de la repetición 1 del extracto de pulpa de açaí purificado.



**Figura 10-** Representa la variación de absorbancia frente a la concentración de la repetición 2 del extracto de pulpa de açaí purificada.



**Figura 11-** Representa la variación de absorbancia frente a la concentración de la repetición 3 del extracto de pulpa de açaí purificada.



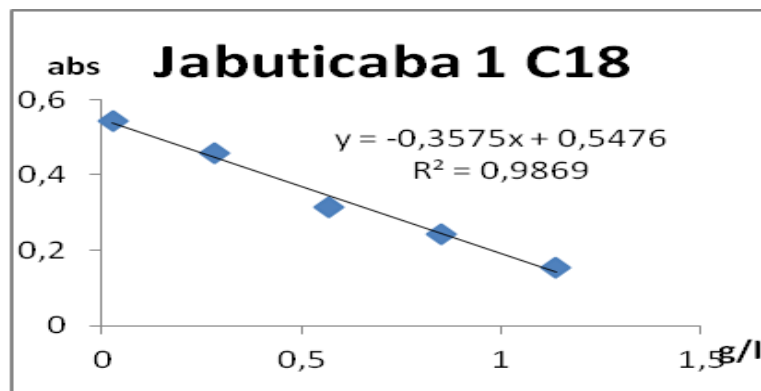


Figura 12- Representa la variación de absorvancia frente a la concentración de la repetición 1 del extracto de cáscara de jabuticaba purificada.

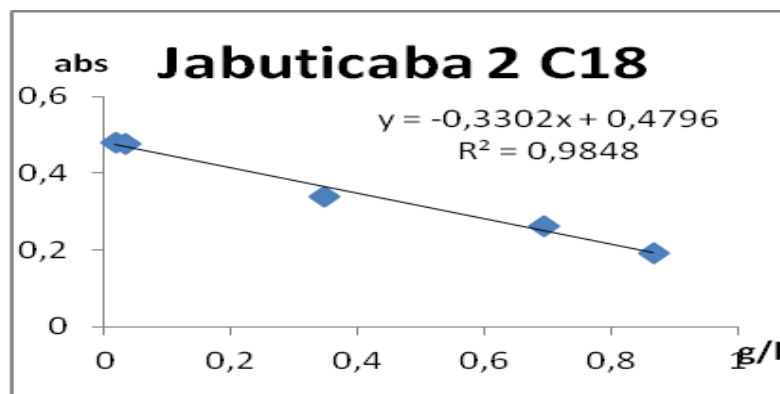


Figura 13- Representa la variación de absorvancia frente a la concentración de la repetición 2 del extracto de cáscara de jabuticaba purificada.

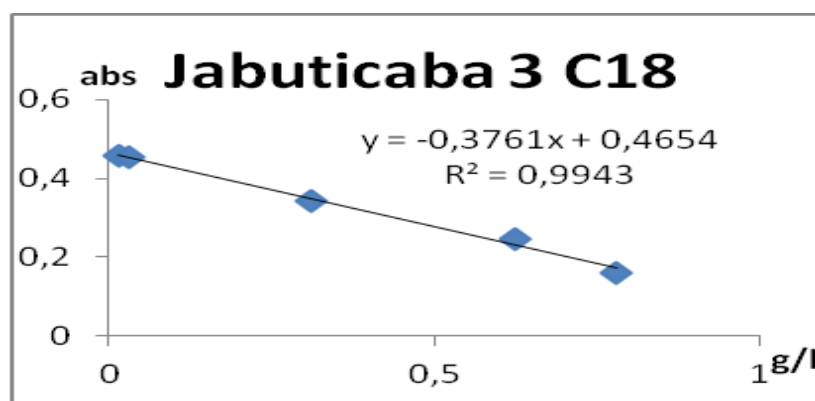


Figura 14- Representa la variación de absorvancia frente a la concentración de la repetición 3 del extracto de cáscara de jabuticaba purificada.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.66, p.232-240, 2007.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. **Methods for testing antioxidant activity.** Analyst, v. 127, p.183-198, 2002.

APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y. I.; SHETTY, K. Potencial of select yogurts for diabetes and hypertension management. **Journal of Food Biochemistry**, v.30, p.699-717, 2006.

ARTS, M. J. T. J., DALLINGA, J. S., VOSS, H. –P., HAENEN, G. R. M. M. Y BAST, A. **A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures.** Food Chemistry, v. 80, p. 409-414, 2003.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS.** Journal of Food Composition and Analysis, v.17, p.385-396, 2004.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Química Nova, v.29, p.113-123, 2006.

BEARA, I. N.; LESJAK, M. M.; JOVEN, E. D.; BALOG, K. J.; ANACKOV, G. T.; ORCIC, D. Z.; et al. **Plantain (Plantago L.) species as novel sources of flavonoides antioxidants.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(19), p.9268–9273, 2009.

BLOIS, M. S. **Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.** Nature, 181(4617), 1199–1200, 1958.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; & BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** LWT – Food Science and Technology, 28(1), p.25–30, 1995.

C´ AVAR, S.; KOVAC, F.; MAKSIMOVIC, M. **Evaluation of the antioxidant activity of a series of 4-methylcoumarins using different testing methods.** Food Chemistry 133 930–937, 2012.

CHIN, Y. W., CHAI, H. B., KELLER, W. J., & KINGHORN, A. D. **Lignans and other constituents of the fruits of Euterpe oleraceae (acai) with antioxidant and**

**cytoprotective activities.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(17), p.7759–7764, 2008.

COÏSSON, J. D.; TRAVAGLIA, F.; PIANA, G.; CAPASSO, M.; & ARLORIO, M. **Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yogurt.** Food Research International, 38, p.893–897, 2005.

CRUZ, A.P.G. **Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante.** 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, RJ, 2008.

DE AGUIAR, P. C. **Antocianinas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) na formulação de bebidas istónicas.**

DE JESUS BOARI, A. M.; DUARTE, A.; CARVALHO, A. P.; PATTO, C. M.; DANTAS-BARROS, A. M. **Caracterização química do fruto jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações,** v.58, p.416-417, 2008.

DE PAULA PEREIRA MACHADO, F. **Efeitos do estágio de maturação e do ambiente de cultivo na capacidade antioxidante de camu-camu (*Myrciaria dubia*),** p.3-5, 2012.

DEL, P. D.; PERCIVAL, S. S.; & TALCOTT, S. T. **Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(4), p.1222–1229, 2006.

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; & TALCOTT, S. T. **Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, p.1222–1229, 2006.

DO SOCORRO, E. L.T. M. **Influência da sazonalidade sobre a composição química e atividade antioxidante do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.),** 2011.

DOS SANTOS, G. M., MAIA, G. A., DE SOUSA, P. H. M., DA COSTA, J. M. C., DE FIGUEIREDO, R. W., & DO PRADO, G. M. **Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.).** Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 58, 187–192, 2008.

DWYER, J. H. et al. **Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the los angeles atherosclerosis study.** Circulation, v.103, p.2922-2927, 2003.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X. D.; BASILE, M.J. and KENNELLY, E.J. **Anthocyanin antioxidants from edible fruits.** Food Chem 84:23–28, 2004.

EKLUND, P. C., LÅNGVIK, O. K., WÄRNÅ, J. P., SALMI, T. O., WILLFÖR, S. M., & SJÖHOLM, R. E. **Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans.** Organic & Biomolecular Chemistry, 3(18), 3336–3347, 2005.

ELISIA, I. et al. **Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract.** Food Chemistry, v.101, p.1052-1058, 2007.

FERREIRA DE ARAUJO RIBEIRO, P. **Compostos bioativos de camu-camu (myrciaria dubia) em função do ambiente de cultivo e do estágio de maturação,** p.V-53, 2012.

FISK II, P. S. et al. **Few favorable associations between fruit and vegetable intake and biomarkers for chronic disease risk in American adults.** Nutrition Research, v.31, p.616-624, 2011.

FULEKI, T. F. J.; FRANCIS, J. **Food sciencie,** 33, p. 72-77, 1968.

FLOEGEL, A.; KIM, D.; CHUNG, S.; KOO, S. I.; CHUN, O. K **Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods.** Journal of Food Composition and Analysis 24 1043–1048, 2011.

FLOEGEL, A.; KIM, D.; CHUNG, S.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. **Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods.** Journal of Food Composition and Analysis 24 1043–1048, 2011.

FRANCIS, F. J. **Anthocyanins and betalains: composition and applications.** Cereal Foods World, v.45, p.208-213, 2000.

GALLORI, S.; BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; BARBOSA, W. L. R.; & VINCIERI, F. F. **Polyphenolic constituents of fruit pulp of Euterpe oleracea Mart. (açai palm).** Chromatographia, 59, p.739–743, 2004.

GAVINHO, C. A. **Efeitos da adubação foliar na produção de frutos e na concentração de ácido ascórbico do camu-camu (Myrciaria dubia (H.B.K.) McVaugh) em condições de terra-firme.** 65 f. Dissertação (Mestrado em

Ciências – Agricultura no Trópico Úmido) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 2005.

GENOVESE, M. I. et al. **Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil.** Food Science and Technology International, v.14, p.207-214, 2008.

GIL, M. I., TOMÁS-BARBER, F. A., HESS-PIERCE, B., HOLCROFT, D. M., & KADER, A. A. **Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(10), 4581–4589, 2000.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.4666-4674, 2010.

GORINSTEIN, S., HARUENKIT, R., POOVARODOM, S., VEARASILP, S., RUAMSUKE, P., NAMIESNIK, J., LEONTOWICZ, M., LEONTOWICZ, H., SUHAJ, M., SHENG, G.P. **Some analytical assays for the determination of bioactivity of exotic fruits.** Phytochemical Analysis 21, 355–362, 2010.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.;& LAJOLO, F. M. **Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, p.2928–2935, 2005..

HALVORSEN, B. L.; BLOMHOFF, R. **Validation of a quantitative assay for the total content of lipophilic and hydrophilic antioxidants in foods.** Food Chemistry 127 761–768, 2011.

HALVORSEN, B. L., HOLTE, K., MYHRSTAD, M. C. W., BARIKMO, I., HVATTUM, E., REMBERG, S. F., et al. **A systematic screening of total antioxidants in dietary plants.** Journal of Nutrition, 132(3), 461–471, 2002.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.;DAI, Y. AND ZHOU, K.. **Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai.** Food Chemistry 118(2): 208-214, 2010.

HONZEL, D.; CARTER, S. G.; REDMAN, K. A.; SCHAUSS, A. G.; ENDRESS, J. R.; & JENSEN, G. S. **Comparison of chemical and cell-based antioxidant methods for evaluation of foods and natural products: Generating multifaceted data by**

**parallel testing using erythrocytes and polymorphonuclear cells.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(18), p.8319–8325, 2008.

IBRAHIM, P. S. **Optimização da extração e microencapsulamento de polifenóis e antocianinas de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*),** 2011.

JENSEN, G. S.; SCHAUSS, A. G.; BEAMAN, R.; & AGER, D. M. **Acai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.): Systematic and collaborative study of the phytochemistry, nutrient composition, and in vitro and in vivo bioactivities of the Amazonian palm fruit in humans.** Alternative Therapies in Health and Medicine, 15(3), p.S90–S91, 2009.

JENSEN, G. S.; WU, X.; PATTERSON, K. M.; BARNES, J.; CARTER, S. G.; SCHERWITZ, L.; et al. **In vitro and in vivo antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(18), p.8326–8333, 2008.

JUSTI, K. C. et al. **Nutritional composition and Vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v.50, p.405-408, 2000.

KANG, J.; XIE, C. H., LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A.; WUB, T. AND WU, X. **Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities.** Food Chemistry 128(1): 152-157, 2011.

KIM, D.-O., CHUN, O.K., KIM, Y.J., MOON, H.Y., LEE, C.Y. **Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 6509–6515, 2003.

KRISHNAIAH, D., SARBATLY, R., & NITHYANANDAM, R. **A review of the antioxidant potential of medicinal plant species.** Food and Bioproducts Processing, 89(3), 217–233, 2011.

LAMBERT, J. D. et al. **Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations.** American Journal of Clinical Nutrition, v.81, p.284S–291S, 2005.

LANDETE, J. M. **Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health.** Food Research International, v.44, p.1150-1160, 2011.

LEES, D. H., & Francis, F. J. **Standardization of pigment analyses in cranberries.**

HortScience, 7(1), 83–84, 1972.

LEITE, A. V.; BATISTA, A. G.; DRAGANO, N. R. V.; MARQUES, A. C.; MALTA, L. G.; RICCIO, M. F.; EBERLIN, M. N.; MACHADO, A. R. T.; DE CARVALHO-SILVA, L. B.; RUIZ, A. L. T. G.; DE CARVALHO, J. E.; PASTORE, G. M.; & JUNIOR, M. R. M. **Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities.** Food Research International, 49, p.596–603, 2012.

LEITE, A. V.; MALTA, L. G.; RICCIO, M. F.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M.; & MAROSTICA, M. R. **Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg).** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 2277–2283, 2011.

LETERME, P.; BULDGEN, A.; ESTRADA, F. AND LONDON, A. M. **Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rainforest of Colombia.** Food Chem 95:644–652, 2006.

LEONG, A. C. N.; KINJO, Y.; TAKO, M.; IWASAKI, H.; OKU, H.; & TAMAKI, H. **Flavonoid glycosides in the shoot system of Okinawa Taimu (*Colocasia esculenta* S.).** Food Chemistry, 119(2), p.630–635, 2010.

Leung WT and Flores M, Food composition table for use in Latin America. INCAP/ICNND, Guatemala (1961). Jaboticaba vitC

LI, C.; DU, H.; WANG, L.; SHU, Q.; ZHENG, Y.; XU, Y.; et al. **Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony (*Paeonia section moutan*) yellow flowers.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(18), p.8496–8503, 2009.

LICHTENTHÄLER, R.; BELANDRINO-RODRIGUES, R.; MAIA, J. G. S.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; & MARX, F. **Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits.** International Journal of Food Sciences and Nutrition, 56(1), p.53–64, 2005.

LER, R.; MARX, F.; & KIND, O. M. **Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay.** European Food Research and Technology, 216, p.166–173, 2003.

MAEDA, R. N. et al. **Determinação da formulação e caracterização do néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh).** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.26, p.70-74, 2006.

MATIAS, G. D.; ARRAES, G. M.; HENRIQUE, P. M.; CORREIA, J. M. D.; DE FIGUEIREDO, R. W.; MATIAS, G. D. **Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart).** Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición .Vol. 58 Nº 2, 2008.

MATSUI, T. et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.1952-1956, 2001.

MCDUGALL, G. J.; STEWART, D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **Biofactors**, v.23, p.189-195, 2005.

MENEZES, E. M. S. **Efeito da alta pressão hidrostática em polpa de açaí pré-congelada (*Euterpe oleracea* Mart.)** 83p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2005.

MENEZES, E. M. S.; TORRES, A. T.; & SABAA SRUR, A. U. **Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.) liofilizada.** Acta Amazônica, 38(2), p.311–316, 2008.

MICHAUD, D. S. et al. **Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts.** American Journal of Clinical Nutrition, v.72, p.990–997, 2000.

MILLER, N. J.; DIPLOCK, A. T.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; & MILNER, A. **A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates.** Clinical Science, 84(4), p.407–412, 1993.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. **Factors influencing the antioxidant activity detrmined by the ABTS radical cation assay.** Free Radial research, v. 26, p. 195-199, 1997.

MIRMIRAN, P. et al. **Fruit and vegetable consumption and risk factors for cardiovascular disease.** Metabolism Clinical and Experimental, v.58, p.460-468, 2009.

MORTON J, **Jaboticabas, in Fruits of Warm Climates**, ed. by MortonJF. Creative Resource Systems, Miami, FL, p. 371–374, 1987.



NACZK, M.; SHAHIDI, F. **Extraction and analysis of phenolics in food.** Journal of Chromatography A, v.1054, p.95-111, 2004.

NEIDA, S.; & ELBA, S. **Characterization of the açai or manaca (*Euterpe oleracea* Mart): A fruit of the Amazon.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 57, p.94–98, 2007.

NORATTO, et al. Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (*Mangifera indica*) varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.4104-4112, 2010.

OBANDA, M.; & OWUOR, P. O. **Flavonol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 74(2), p.209–215, 1997.

OU, B., HUANG, D., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J.A.J., DEEMER, E.K. **Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 3122–3128, 2002.

PACHECO, L.A., P. HAWKEN AND S.T. TALCOTT. **Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage.** Food Research International 40(5): 620-628., 2007.

PACHECO, L.A; TALCOTT, S. T.; SAFE, S. AND MERTENS, T. S. **Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil in vitro.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(10): 3593-3600, 2008.

PACHECO PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. **Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*.** Food chemistry 115, p. 1199-1205, 2009.

PELLEGRINI, N., SERAFINI, M., COLOMBI, B., RIO, D. D., SALVATORE, S., BIANCHI, M., ET AL. **Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays.** Journal of Nutrition, 133, 2812–2819, 2003.

PRIOR, R. L., WU, X., & SCHAICH, K. **Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10), 4290–4302, 2005.

Purdue, Jaboticaba. [Online]. Available: <http://hort.purdue.edu/newcrop/morton/jaboticabas.html> [23 November 2001]. Jaboticaba vitC

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay**. Free Radical Biology and Medicine, v.26, p.1231-1237, 1999.

REYNERTSON, K. A. et al. **Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits**. Food Chemistry, v.109, p.883-890, 2008.

RIBEIRO, P. F. A. et al. Benefits of blackberry nectar (*Rubus* spp.) relative to hypercholesterolemia and lipid peroxidation. **Nutrición Hospitalaria**, v.26, p.984-990, 2011.

ROCHA, A. P.; CARVALHO, L. C.; SOUSA, M. A.; MADEIRA, S. V.; SOUSA, P. J.; & TANO, T. **Endothelium-dependent vasodilator effect of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat**. Vascular Pharmacology, 46, p.97-104, 2007.

ROJANO, B.A; ZAPATA, I.C.V; ALZATE, A.F.A; MOSQUERA, A.J.M; CORTÉS, F.B,C; y GAMBOA, L.C. **Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto Liofilizado de Palma Naidi (Açaí Colombiano) (Euterpe oleracea Mart)**. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín 64(2): 6213-6220. 2011

ROUTRAY, W.; ORSAT, V. **Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review**. Food and Bioprocess Technology, v.4, p.409-424, 2012.

RUFINO, M. M.; FERNANDES, F. A. N.; ALVES, R. E.; & BRITO, E. S. **Free radicalscavenging behavior of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system**. Food Chemistry, 114(2), p.693-695, 2009.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PE´REZ-JIME´NEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; & MANCINI-FILHO, J. **Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil**. Food Chemistry, 121, p.996-1002, 2010.

RUFINO, M.; PÉREZ, J.; ARRANZ, S.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E.; OLIVEIRA, M. AND SAURA, F. **Açaí (Euterpe oleracea) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil**. Food Research International 44(7): 2100-2106, 2011.

SAIGNE-SOULARD, C. et al. **<sup>13</sup>C NMR analysis of polyphenol biosynthesis in grape cells: Impact of various inducing factors.** *Analytica Chimica Acta*, v.563, p.137-144, 2006.

SAMANIEGO SANCHEZ, C., TRONCOSO GONZALEZ, A.M., GARCIA-PARRILLA, M.C., QUESADA GRANADOS, J.J., LOPEZ GARCIA DE LA SERRANA, H., LOPEZ MARTINEZ, M.C. **Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content.** *Analytica Chimica Acta* 593, 103–107, 2007.

SCHAUSS, A. G.; JENSEN, G. S.; WU, X.; & SCHERWITZ, L. **Increased antioxidant capacity and inhibition of lipid peroxidation in healthy adults consuming Monavie Active, an acai (*Euterpe oleracea*) fruit based juice.** *Acta Horticulturae*, 841, p.97–100, 2009.

SCHAUSS, A. S.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B. O.; HUANG, D.; OWENS, J.; et al. **Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, p.8604–8610, 2006a.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; et al. **Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, p.8598–8603, 2006b.

SCHLLEMER, M. A. **Antioxidante e antimicrobiano de extratos de frutas nativas do bioma floresta com araucaria.** XIV SICITE - UTFPR -\*- Volume I -\*- Seção Alimentos.

SILVA, P.I. **Otimização da extração e microencapsulamento de fenólicos e antocianinas de jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*).** 159p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. ***American Journal of Enology and Viticulture***, v.16, p.144–158, 1965.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B. AND LUGASI, A. **Functional food product development, marketing and consumer.** A review. *Appetite* 51(3): 456-467, 2008.

SOERJOMATARAM, I. et al. **Increased consumption of fruit and vegetables and future cancer incidence in selected European countries.** *European Journal of Cancer*, v.46, p.2563-2580, 2010.

SONG, Y. et al. Associations of dietary flavonoids with risk of Type 2 diabetes and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. **Journal of the American College of Nutrition**, v.24, p.376-384, 2005.

SOUZA, M. O.; SILVA, M.; SILVA, M. E.; OLIVEIRA, R. P.; & PEDROSA, M. L. **Diet supplementation with açai (Euterpe oleracea Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats.** Nutrition, 26(7–8), p.804–810, 2010.

SPADA, P. D.; DANI, C.; BORTOLINI, G. V.; FUNCHAL, C.; HENRIQUES, J. A.; & SALVADOR, M. **Frozen fruit pulp of Euterpe oleraceae Mart. (acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats.** Journal of Medicinal Food, 12(5), p 1084–1088, 2009.

STRUDWICK, J.; & SOBEL, G. L. **Uses of Euterpe oleracea Mart. in the Amazon estuary, Brazil.** Advances in Economic Botany, 6, p.225–253, 1988.

TACO, **Tabela brasileira de composição de alimentos.** NEPA-UNICAMP, Campinas, Brazil (2006).

TIWARI, A. K. Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. **Current Science**, v.86, p.1092-1102, 2004.

TREVISAN, L. M.; BOBBIO, F. O. AND BOBBIO, P. A. **Carbohydrates, organic acids and anthocyanins of Myrciaria jaboticaba.** J Food Sci 37:818–819, 1972.

VIEIRA, A. L.; BATISTA, A. G.; ROMANELLI, N. V. D.; CASTRO, A. M.; GOMES, L. M.; RICCIO, M. F.; MOGUEIRA, M. E.; THOMAZELA, A. R. M.; DE CARVALHO-SILVA, L. B.; TASCA, A. L. G. R.; DE CARVALHO, J. E.; PASTORE, G. M.; MARÓSTICA, M. R. J. **Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities.** Food Research International, 49, p. 596-603, 2012.

VILLANO, D., FERNÁNDEZ-PACHON, M. S., TRONCOSO, A. M., & GARCÍA-PARRILLA, M. C. **Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro.** Analytica Chimica Acta, 538(1–2), 391–398, 2005.

VITA, J. A. **Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function.** American Journal of Clinical Nutrition, v.81, p.292S–297S, 2005.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; & PRIOR, R. L. **Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(12), p.4026–4037, 2004.

YUYAMA, K. A. **Cultura de camu-camu no Brasil.** Revista Brasileira de Fruticultura, v.33, p.1-2, 2011.

YUYAMA, K., AGUIAR, J. P. L., YUYAMA, L. K. O. **Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C.** Acta Amazônica, v.32, p.169-174, 2002.

ZANATTA, C. F. et al. **Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.53, p.9531-9535, 2005.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. **Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*).** Food Chemistry, v.101, p.1526-1532, 2007.